



N° 898.098

Classif. Internat.: A23C/C12Q/C12R

Mis en lecture le:

15 -02- 1984

LE Ministre des Affaires Economiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;**Vu le procès-verbal dressé le 27 octobre 19 83 à 15 h. 20*

au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. - Il est délivré à la Sté dite : APLIN & BARRETT LTD.
15 North Street, Beaminster, Dorset, DT8 3DZ (Grande-Bretagne)

repr. par le Bureau Gevers S.A. à Bruxelles,

un brevet d'invention pour: Procédé de contrôle de l'élaboration de toxine botulique dans des produits à base de fromage et produits ainsi obtenus,

qu'elle déclare avoir fait l'objet d'une demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique le 10 juin 1983, n° 503.305 au nom de S.L. Taylor dont elle est l'ayant cause

Article 2. - Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 14 novembre 19 83
PAR DELEGATION SPECIALE:

Le Directeur


L. WUYTS

898098

MEMOIRE DESCRIPTIF

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

formée par

Aplin & Barrett, LTD.

pour:

"Procédé de contrôle de l'élaboration de toxine botulique
dans des produits à base de fromage et produits ainsi
obtenus"

Priorité d'une demande de brevet aux Etats-Unis
d'Amérique déposée le 10 juin 1983, sous le n° 503.305,
au nom de Stephen Lloyd Taylor



"Procédé de contrôle de l'élaboration de toxine botulique dans des produits à base de fromage et produits ainsi obtenus"

5 La nisine, une substance antimicrobienne produite par certaines souches de Streptococcus lactis, est connue pour être utilisée dans la préservation des aliments. Elle a la propriété d'inhiber la croissance de certaines bactéries gram-positives, mais non les bactéries gram-négatives ou les levures ou moisissures. Une autre
10 propriété, qui est la plus importante en pratique, réside dans la capacité de la nisine d'empêcher la prolifération de spores bactériens germés. L'utilisation commerciale de la nisine concerne principalement actuellement la propriété d'empêcher la prolifération de spores bac-
15 tériens germés, ce qui dans certaines applications a pour effet d'empêcher l'altération d'aliments qui ont reçu un traitement thermique au moins suffisant pour détruire les cellules bactériennes végétatives. Une autre utilisation classique a consisté à empêcher une altération
20 clostridiale de produits de type fromage traité, qui reçoivent un traitement thermique moins sévère.

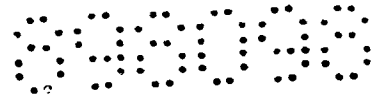
L'utilisation de nisine dans des produits de type fromage traité a fait l'objet de brevets antérieurs; voir notamment le brevet britannique 713.251 et le
25 brevet aux Etats-Unis d'Amérique n° 2.744.827. Ces brevets concernent la fabrication ou la conservation de

fromages de types capables de gonfler ou de se dilater à la suite de la croissance d'organismes qui ont pour effet une altération et qui sont des générateurs de spores anaérobies , en particulier les bactéries connues sous le nom de Clostridia. Ils concernent également un fromage traité qui est susceptible d'être avarié comme indiqué ci-dessus. Les teneurs en nisine auxquelles on fait référence dans ces brevets sont de l'ordre de 50 à 375 unités par g. Une "unité" est équivalente à 1 unité internationale (U.I.) d'activité de nisine et elle est équivalente à 0,025 microgramme de nisine.

Jusqu'à récemment, on ne considérait pas que des produits de type fromage traité seraient susceptibles d'être avariés par des organismes tels que Clostridium botulinum ou que la production de la toxine associée présenterait un risque potentiel pour la santé. Cependant, des découvertes récentes montrent que de tels risques peuvent exister, en particulier dans des formulations de fromage traité où la teneur en eau dépasse 54%. Voir Kautter et cons. "Toxin Production by Clostridium botulinum in Shelf-Stable Pasteurized Process Cheese Spreads", Journal of Food Protection, 42 pp. 784-786 (1979); Scott et Taylor, "Effect of Nisin on the Outgrowth of Clostridium botulinum Spores", J. Food Sci., 66(1) pp. 117-120 (1981); Scott et Taylor, "Temperature, pH, and Spore Load Effects on the Ability of Nisin to Prevent on the Outgrowth of Clostridium botulinum Spores", J. Food Sci. 46(1): 121-126 (1981); et Somers et Taylor, Research Note - "Further Studies on the Antibotulinal Effectiveness of Nisin in Acidic Media", J. Food Sci., 46(6): p. 1972-3.

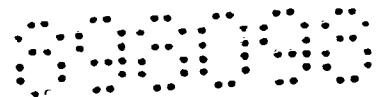
Des études au niveau fondamental ont montré que





la nisine a la capacité d'inhiber la croissance des spores botuliques provenant de différentes sources de culture et de type. Cependant la découverte importante est que les teneurs en nisine nécessaires pour réaliser une inhibition totale sont beaucoup plus hautes pour *Clostridium botulinum* que pour d'autres clostridia non pathogènes ou générateurs de spores aérobiques, communément rencontrés comme étant des organismes qui rendent les aliments avariés. On a en outre démontré dans une étude de durée de vie à l'entreposage prolongé, avec un fromage traité à tartiner à teneur réduite en sodium et à haute teneur en humidité, qu'une inhibition totale de la prolifération des spores de *Clostridium botulinum* est obtenue pour une addition de nisine d'une valeur de 250 ppm (10000 U.I. de nisine/g). Cette teneur en nisine est vingt fois le taux d'addition maximum dans la pratique commerciale courante.

La présente invention comprend un procédé d'inhibition sensiblement total de la prolifération des spores germés de *Clostridium botulinum* dans des fromages traités à tartiner, pasteurisés, à haute teneur en humidité, qui présentent notamment une teneur en humidité de l'ordre d'environ 54 à environ 60% en poids et une teneur en sodium réduite de l'ordre de 40 à environ 50% de réduction par rapport aux formulations commerciales typiques qui contiennent 2,55% de phosphate disodique et 2,0% de chlorure de sodium, ce procédé comprenant le traitement de ce fromage traité par addition à ce dernier d'une quantité de nisine ou de culture bactérienne productrice de nisine suffisante pour inhiber la prolifération des spores botuliques, la quantité étant généralement d'en-



viron 2000 à environ 10000 unités internationales (ou un équivalent).

Les formulations de fromage traité, en particulier de fromages traités pasteurisés, sont définies par les standards d'identité de l'administration des aliments et médicaments des Etats-Unis d'Amérique comme étant un aliment préparé par broyage et mélange, à l'aide de chaleur, d'un ou de plusieurs fromages de la même ou de deux variétés ou davantage avec un agent émulsifiant prescrit en une masse plastique homogène. Des ingrédients éventuels peuvent être inclus. Le fromage traité pasteurisé est défini au 21 CFR 133.169 et suivants comme comprenant des teneurs en humidité, normalement supérieures à 44% d'humidité et habituellement d'au moins 54% d'humidité, mais pas plus de 60% d'humidité; voir 133.179(a) (3). Les paragraphes 133.169-180 du 21 CFR sont incorporés ici en référence pour permettre l'explication de l'invention.


Le botulisme humain est presque invariablement le résultat de l'absorption d'aliments en conserve dans lesquels les bactéries, *Clostridium botulinum*, se sont développées et ont produit une toxine. Il apparaît que, lorsque la teneur en humidité de fromages ou produits de fromage traités à tartiner, pasteurisés, non réfrigérés, augmente, l'incidence de la toxine produite par *Clostridium botulinum* croît également. L'espèce *Clostridium botulinum* est divisée en types A à G sur la base de différences antigéniques entre les toxines; les types A, B et E ont une grande importance pratique aux Etats-Unis d'Amérique parce qu'ils sont ceux qui sont toxiques pour les êtres humains. Parmi ces types, la toxine du

type A est la toxine la plus puissante et elle est considérée comme la substance toxique connue, la plus puissante.

La nisine est un polypeptide produit par certaines souches de streptocoques lactiques, Streptococcus lactis. La préparation de nisine la plus puissante contient 40 millions d' U.I. par gramme. La Nisapline est un concentré de nisine commercial qui contient 1 million d' U.I. par gramme et qui est mis sur le marché par Aplin & Barrett Ltd., Beaminster, Dorset, Grande-Bretagne.

Pour déterminer l'efficacité de la nisine pour empêcher la prolifération de spores de Clostridium botulinum et la formation subséquente de toxine dans des fromages traités à tartiner, les expériences suivantes ont été effectuées.

Cultures bactériennes: Cinq souches sont utilisées, chacune des types A et B de Clostridium Botulinum (A: 56, 62, 69, 77, et 90; B: 53, 113, 213, 13983, et Lamanna-okra). Chaque souche a été développée d'une manière favorable à une sporulation, comme dans Christiansen et cons, Appl. Microbiol. 27, pp. 733-737. Les formations de spores sont récoltées par une centrifugation suivie d'un lavage approfondi par de l'eau stérile. La boulette finale est remise en suspension dans de l'eau stérile pour former 10 ml et les suspensions individuelles de spores sont entreposées à l'état congelé. Une partie de chaque suspension de spores individuelle est dégelée et diluée dans 0,1% de peptone-eau pour effectuer une énumération des spores (voir ci-dessous). Après énumération, des dilutions appropriées des préparations individuelles de spores sont effectuées dans de l'eau stérile et elles sont combinées pour former un produit d'inoculation mixte



constitué d'un nombre approximativement égal de chaque souche. Ces préparations de spores mixtes sont diluées de manière appropriée dans 0,1% de peptone-eau avant d'être ajoutées au fromage fondu.

- 5 Enumération de *C. botulinum*: Cette énumération est effectuée par la technique du nombre le plus probable (ci-après NLP) à 5 tubes qui utilise du TPYG comme milieu de croissance suivant le FDA Bacteriological Analytical Manual for Foods (1976). Pour les comptes
- 10 de spores, les suspensions de spores sont diluées dans 0,1% de peptone-eau et elles sont secouées à chaud à 80°C pendant 10 minutes avant l'énumération. Avec les échantillons de fromage entreposés, des procédés de secouage à chaud semblables sont utilisés. Les tubes
- 15 qui montrent une croissance bactérienne sont examinés en ce qui concerne la présence de toxine par l'essai de protection de la souris. Seuls les tubes positifs quant à la toxine sont comptés dans la détermination du nombre le plus probable de *C. botulinum*. Le milieu TPYG
- 20 est constitué de 5% de trypticase peptone, de 0,5% de bactopeptone, de 2% d'extrait de levure, de 0,4% de glucose, et de 0,1% de thioglycolate de sodium. Le pH du milieu TPYG est ajusté à 6 avant le traitement en autoclave. La peptone-eau n'est pas ajustée avant le
- 25 traitement en autoclave.

- Extraction et dosage de toxine: Le procédé de Tanaka et cons., noté précédemment, est utilisé pour l'extraction et le dosage de la toxine. 10 g de chaque échantillon d'essai sont mélangés à un volume égal de gélatine-tampon de phosphate, à un pH de 6,2. Le mélange
- 30 est centrifugé à 5000 x g pendant 10 minutes et la fraction surnageante aqueuse est analysée en ce qui concerne



la présence de toxine. Le procédé d'extraction permet une récupération complète de la toxine ajoutée. Pour des dosages de toxine du bouillon de TPYG utilisé dans le procédé de NLP, le milieu est centrifugé à 5000 x g pendant 10 minutes, et le surnageant est analysé en ce qui concerne la présence de toxine.

Dans l'examen de protection de la souris pour une toxine botulique (FDA Bacteriological Analytical Manual for Foods, 1976), deux souris sont chacune inoculées par voie intrapéritonéale par 0,5 ml de l'extrait provenant de l'échantillon d'essai. Les souris sont maintenues pendant 4 jours et examinées en ce qui concerne les symptômes et la mort caractéristiques d'une intoxication par *C. botulinum*. Lorsque la mort apparaît, deux souris supplémentaires sont soumises à un mélange échantillon-antitoxine qui est préalablement incubé à 37°C pendant 30 minutes. Des témoins non protégés sont à nouveau inoculés de façon qu'ils puissent être examinés simultanément avec les souris protégées. Des morts non spécifiques, dues à l'extrait de fromage, ne se produisent pas.

Fromage: Un mélange de fromage américain, de lait maigre déshydraté, et d'extrait de petit-lait est utilisé. Cela est mélangé, et un produit uniforme est scellé dans des sacs en matière plastique, étanches à l'humidité, et maintenu à l'état congelé jusqu'à ce qu'on en ait besoin. Ce procédé de préparation assure une source uniforme de matière première pour toutes les expériences. Le mélange est préparé avec la teneur en humidité la plus faible possible. La quantité de nisine naturellement présente dans ce produit est déterminée

comme étant en dessous de la limite inférieure de possibilité de détection de dosage de nisine suivant Tramer et cons., J. Sci. Food Agric., 15:522-528 (1964).

Formulation: Cinq lots de fromage traité à tartiner sont préparés. Le lot n° 1 est réalisé à une teneur en humidité de 54% avec 1,35% de phosphate de sodium, 1,1% de chlorure de sodium et 0,2% d'acide lactique. Ce lot sert de témoin peu susceptible d'être avarié. Les lots 2 à 5 sont préparés à un taux d'humidité de 58% avec 1,45% de phosphate de sodium et 1,2% de chlorure de sodium. Le lot 2 ne contient pas de nisine; le lot 3 a 12,5 ppm de nisine; le lot 4 contient 100 ppm de nisine; et le lot 5 contient 250 ppm de nisine. Les formulations des différents lots sont données dans le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

Formulation de fromages traités à tartiner

Lot n°	Taux d'humidité	% de phosphate de sodium	% de chlorure de sodium	ppm de nisine
20 1	54	1,35	1,1	0
2	58	1,45	1,2	0
3	58	1,45	1,2	12,5
4	58	1,45	1,2	100
5	58	1,45	1,2	150

Préparation et inoculation des fromages à tartiner: le fromage est traité dans un chaudron à chemise de vapeur, couvert et soumis à une agitation. Le chaudron reçoit les lots de 1360 g. Chaque lot est complété par la réalisation de quatre lots secondaires. Avec l'utilisation des petits lots secondaires, un ajustement très minutieux du taux d'humidité est obtenu et les lots secondaires sont de composition très semblable.



Le mélange à base de fromage, l'eau, le phosphate disodique, le chlorure de sodium, l'acide lactique et la Nisapline, une formulation commerciale présentant 1×10^6 U.I./g, 74,7% de chlorure de sodium et 23% d'extrait de lait maigre déshydraté, sont pesés dans le chaudron. Le mélange est chauffé à 88°C et maintenu à cette température pendant 2 minutes. Des échantillons non inoculés sont alors retirés pour effectuer des analyses du taux d'humidité, du pH et du sel (voir ci-dessous). Le mélange de spores de *C. botulinum* est alors ajouté au reste du produit pour donner un taux de spores final de 1000 spores/g. La température du produit inoculé est conservée à 88°C pendant encore 2 minutes, sous agitation.

Le produit traité est versé dans de petits flacons en verre, environ 21 g par flacon, jusqu'à juste en dessous du bord, et les capuchons à visser sont fermés de manière étanche. 180 flacons sont préparés pour chaque lot. Les flacons remplis sont refroidis dans un réfrigérateur pendant au moins 1 heure, ils sont placés dans des récipients d'anérobiose, et on les laisse incuber comme indiqué ci-dessous.

Programme d'incubation et de prélèvement: les échantillons sont incubés dans deux voies différentes. Dans la première méthode, les échantillons sont incubés pendant jusqu'à 48 semaines à 30°C. Dans la seconde méthode, les échantillons sont maintenus à 4°C pendant 8 semaines puis ils sont incubés à 30°C pendant jusqu'à 48 semaines.

Chaque lot expérimental est examiné pour voir s'il est avarié (gaz, changement de couleur non uniforme,

E

séparation de phase) à 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 et 48 semaines et si c'est applicable à 0 et 8 semaines d'entreposage réfrigéré. Les échantillons sont examinés de manière routinière en ce qui concerne la toxine à 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36 et 48 semaines et si c'est applicable après 8 semaines d'entreposage réfrigéré. En plus, des échantillons, qui montrent des signes évidents d'état avarié, sont examinés pour ce qui concerne la toxine aussitôt que cet état avarié est noté. Pour l'analyse de toxine, un minimum de 10 échantillons par lot est examiné de manière approfondie.

Le nombre d'organismes viables de *C. botulinum* est déterminé par la méthode NLP à cinq tubes sur chaque lot, immédiatement à la suite de la formulation du lot. De plus, des NLP sont réalisés sur tout échantillon qui ne s'écoule pas ou devient toxique à la quarante-huitième semaine d'entreposage (un maximum de 10 récipients par lot).

L'analyse de nisine est effectuée sur 10 récipients de chaque lot à 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36 et 48 semaines et, si c'est applicable, à 0, 4, et 8 semaines d'entreposage réfrigéré.

Analyse chimique des échantillons non inoculés: des analyses de taux d'humidité total et de chlorure de sodium sont effectuées à trois reprises par des procédés AOAC recommandés. Deux procédés d'analyse de taux d'humidité sont donnés dans le manuel AOAC (Assoc. Off. Anal. Chem., 12e éd., 1976); le procédé à l'étuve à vide à 100°C est utilisé dans cette étude. Le procédé des Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Bianco et cons., 1972) est utilisé pour mesurer le pH

du produit fini. L'analyse de nisine est effectuée par le procédé d'examen de *Micrococcus flavus* de Tramer et Fowler, noté précédemment.

Discussion des résultats: l'efficacité de la nisine pour empêcher la prolifération des spores de *C. botulinum* dans des fromages traités à tartiner, incubés à 30°C pendant jusqu'à 48 semaines, est représentée sur le Tableau II. Un total de sept échantillons toxiques est trouvé dans le lot 1, le témoin à faible taux d'humidité, pendant la période de 48 semaines. Cependant, dans le lot 2, qui présente un taux d'humidité de 57,0%, tous les échantillons deviennent toxiques à la huitième semaine d'entreposage. Dans le lot 3, qui présente également un taux d'humidité de 57,0% mais contient aussi 12,5 ppm de nisine la majorité des échantillons devient toxique à la seizième semaine d'incubation bien que quelques échantillons survivent pendant la totalité de la période de 48 semaines. La nisine à une teneur de 12,5 ppm retarde la prolifération et la production de toxine mais elle ne l'empêche pas. Au contraire, des échantillons très peu toxiques sont obtenus dans les lots 4 et 5 pendant la période d'incubation de 48 semaines. Les analyses des échantillons du lot 4, qui présentent un taux d'humidité de 56,8% et 100 ppm de nisine, donnent seulement trois échantillons toxiques pendant la totalité de la période. On n'a découvert aucun échantillon toxique pendant l'incubation du lot 5 qui présente un taux d'humidité de 56,7% et 250 ppm de nisine. Les données du NLP dans le Tableau II indiquent que les spores restent viables pendant la période d'incubation mais que leur prolifération est empêchée par la nisine.



Sur la base de cette donnée, il apparaît que la nisine exerce un effet sporostatique sur les spores dans des fromages traités à tartiner.

5

Tableau II

Production de toxine dans du fromage traité à tartiner, incubé à 30°C

Lot	Taux d'humidité ^a %	NLP/g initial ^b	NLP/g final ^c
1	52,4 ± 0,6	2,92 x 10 ³	7,72 x 10 ³
10 2	57,0 ± 0,3	4,95 x 10 ³	-----
3	57,0 ± 0,3	3,05 x 10 ³	5,60 x 10 ²
4	56,8 ± 1,0	2,38 x 10 ³	4,00 x 10 ³
5	56,7 ± 0,3	2,40 x 10 ³	4,50 x 10 ²

15

a) Moyenne ± déviation standard. des taux d'humidité dans les lots secondaires individuels.

b) Moyenne des NLP obtenus pour des lots secondaires individuels.

20

c) Moyenne des NLP obtenus pour 2 à 5 des échantillons restants à 48 semaines.



Tableau II (suite)

Production de toxine dans du fromage traité à tartiner, incubé à 30°C.

5 Nombre d'échantillons toxiques/nombre d'échantillons analysés de manière aléatoire aux périodes d'inspection hebdomadaires suivantes :

	<u>Lot</u>	<u>0</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>12</u>	<u>16</u>	<u>24</u>	<u>36</u>	<u>48</u>
	1	0/10	0/10	1/10 +1 ^d	2/10	0/10	0/10	2/10 +2 ^c	0/10
10	2	0/4	4/10 +68 ^d	10/10 +8 ^d	----	----	----	----	----
	3	0/4	4/10 +18 ^d	7/10 +20 ^d	8/10 +3 ^d	8/10 +1 ^d	----	----	1/4
	4	0/4	0/10	1/10 +1 ^d	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10
15	5	0/4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

c) Moyenne des NLP obtenue pour 2 à 5 des échantillons restants à 48 semaines.

20 d) Nombre supplémentaire d'échantillons avariés et toxiques identifiés à cette période de prélèvement.

L'efficacité antibotulique de la nisine dans des fromages traités à tartiner n'est pas altérée de manière appréciable par incubation à 4°C pendant 8 semaines avant l'incubation à 30°C pendant 48 semaines (Tableau III). Comme précédemment, un nombre limité d'échantillons toxiques développés dans le lot 1, le témoin à faible taux d'humidité. Avec les lots 2 et 3, état avarié et production de toxine apparaissent rapidement pendant la période d'incubation. Avec le lot 3, la production de toxine n'est pas retardée pour 12,5 ppm de nisine, comme cela semblait être le cas dans l'expérience précédente



(Tableau II). A nouveau, un nombre limité d'échantillons toxiques est obtenu avec le lot 4, contenant 100 ppm de nisine, et aucun échantillon toxique n'est trouvé sur la période de 48 semaines à une teneur de 250 ppm de nisine, c'est-à-dire dans le lot 5.

Tableau III

Production de toxine dans du fromage traité à tartiner, maintenu pendant 8 semaines à 4°C avant l'incubation à 30°C

Lot	Taux d'humidité ^a %	LPN/g initial ^b	LPN/g final ^c
1	52,4 ± 0,6	2,92 x 10 ³	4,20 x 10 ³
2	57,0 ± 0,3	4,95 x 10 ³	----
3	57,0 ± 0,3	3,05 x 10 ³	1,50 x 10 ²
4	56,8 ± 1,0	2,38 x 10 ³	2,60 x 10 ²
5	56,7 ± 0,3	2,40 x 10 ³	2,50 x 10 ²

a) Moyenne ± déviation standard des taux d'humidité dans les lots secondaires individuels.

b) Moyenne des LPN obtenus pour des lots secondaires individuels.

c) Moyenne des LPN obtenus pour 2 à 5 des échantillons restants à 48 semaines.

E

Tableau III (Suite)

Production de toxine dans du fromage traité à tartiner, maintenu pendant 8 semaines à 4°C avant l'incubation à 30°C

5	<u>Lot</u>	<u>-8^d</u>	<u>0</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>12</u>
	1	0/10	0/10	0/10	2/10	---
	2	0/10	0/10	10/10	10/10	---
				+ 54 ^e	+ 5 ^e	
	3	0/10	0/10	9/10	7/10	3 ^e
10				+ 16 ^e	+ 22 ^e	
	4	0/10	0/10	0/10	3/10	---
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	---
	<u>Lot</u>	<u>16</u>	<u>24</u>	<u>36</u>	<u>48</u>	
	1	0/10	1/10	1/10	0/10	
15		+ 3		+ 2		
	2	---	---	---	---	
	3	2 ^e	1 ^e	---	1/2	
	4	2/10	1/10	0/10	0/10	
20	5	0/10	0/10	0/10	0/10	

d) Données obtenues au début de la période de 8 semaines d'entreposage réfrigéré.

e) Nombre supplémentaire d'échantillons avariés et toxiques identifiés à cette période de prélèvement.

25 Les teneurs en nisine résiduelles, obtenues avec les fromages traités à tartiner suivant les deux modes d'incubation, sont indiquées dans les Tableaux IV et V. Le dosage de la nisine par voie biologique ne donne pas de résultats particulièrement cohérents. L'incohérence

30 peut être due à divers facteurs y compris la fixation de la nisine dans la masse de fromage, une extraction incomplète et peu importante de la nisine, et certaines diffi-

✓

cultés techniques avec le dosage. biologique lui-même de la nisine. Les problèmes de fixation et d'extraction apparaissent être les difficultés les plus sérieuses. Les données dans les Tableaux IV et V indiquent de manière nette que la nisine ne se décompose pas à l'entreposage dans des fromages traités à tartiner. On n'a découvert aucune trace de décomposition de nisine à l'entreposage réfrigéré (Tableau V). Des teneurs appréciables en nisine (50% ou davantage de la teneur ajoutée) sont trouvées dans des échantillons incubés pendant 48 semaines à 30°C.

Tableau IV

Teneurs en nisine résiduaire dans des échantillons de fromage traité à tartiner, incubés à 30°C

Lot	0	4	8	12	16	24	36	48
1	PF ^a	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF
2	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF
3	11,8	17,5	8,9	2,1	6,9	PF ^b	PF ^b	6,1
4	73,2	123	34,5	75,3	44,7	51,8	11,9	46,5
5	187	246	68,6	238	167	11,9	110	144

a) Pas fait; la nisine n'est pas ajoutée aux lots 1 et 2.

b) Pas fait, parce qu'un nombre insuffisant d'échantillons non avariés était disponible.



Tableau V

Teneurs en nisine résiduaire dans des échantillons de fromage traité à tartiner maintenus à 4°C pendant 8 semaines avant l'incubation à 30°C

5

Teneur en nisine (ppm) à la semaine :

<u>Lot</u>	<u>-8^a</u>	<u>0</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>12</u>	<u>16</u>	<u>24</u>	<u>36</u>	<u>48</u>
1	PF ^b	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF
2	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF
10 3	11,8	17,2	2,6	6,4	PF ^c	PF ^c	PF ^c	PF ^c	9,8
4	73,2	44,5	55,4	74,7	PF	15,3	49,4	4,8	30,1
5	187	274	320	245	PF	140	148	22,6	150

15

a) Données obtenues au début d'une période de 8 semaines d'entreposage réfrigéré.

b) Pas fait; la nisine n' a pas été ajoutée aux lots 1 et 2.

c) Pas fait, parce qu'un nombre insuffisant d'échantillons non avariés était disponible.

20

En se basant sur nos études on a découvert que la nisine est un agent antibotulique efficace dans des fromages traités à tartiner, à haut taux d'humidité. Les fromages traités à tartiner à taux d'humidité de 57%, sans nisine, souffrent d'une prolifération de spores de C. botulinum et ils permettent l'apparition d'une production de toxine dans les premières semaines d'incubation à 30°C. Une addition de nisine à 100 ppm limite sévèrement la prolifération et la production de toxine et une addition de nisine de 250 ppm empêche complètement la prolifération et la production de toxine. Une teneur en nisine de 12,5 ppm est inefficace.

25

30



Les teneurs en nisine nécessaires pour empêcher la prolifération botulique et la production de toxine dans des fromages traités à tartiner présentant un haut taux d'humidité sont plus élevées que les teneurs requises dans un bouillon de TPYG; voir Scot et Taylor, J. Food Sci., 46:117-120 et 121-126, et Somers, J. Food Sci., 46:1972-3, tous notés précédemment. Dans la bouillie de TPYG, les teneurs en nisine de 12,5 à 25 ppm sont efficaces dans le réglage de la prolifération et de la production de toxine pour les spores de type A et B à un pH de 6 et à une charge de spores de 10^3 spores/ml. Ces conditions coïncident davantage avec les conditions présentes dans le fromage traité à tartiner. Les études dans du bouillon de TPYG indiquent que la température de secouage à chaud, le pH, et la charge de spores sont des facteurs critiques dans la détermination de la teneur en nisine requise pour empêcher la prolifération et la production de toxine par des spores de C. botulinum. Apparemment, d'autres facteurs existent qui limitent l'efficacité antibotulique de la nisine dans des fromages traités à tartiner. La fixation de nisine dans la masse de fromage ou des limitations au contact entre la nisine et les spores, qui sont dues à cette masse, peuvent être responsables, bien qu'on n'ait pas d'informations directes pour expliquer la différence entre les teneurs en nisine inhibitrices dans des fromages traités à tartiner et celles dans du bouillon de TPYG.

Il faut faire un certain commentaire sur les formulations de fromage utilisées dans cette étude, par opposition aux formulations de fromage traité à tartiner américain "typique". Tanaka et cons. ont montré que des

E

formulations typiques ne subissent pas de prolifération botulique et de production de toxine. Leurs formulations typiques contiennent soit 52% soit 54% de taux d'humidité et 2,5% de phosphate disodique, plus 2,0% de chlorure de sodium. De plus, Tanaka et cons. ont démontré que des fromages traités à tartiner présentant un taux d'humidité de 58% et réalisés avec soit 2,5% de phosphate disodique, soit 3,0% de citrate de sodium, subissent une prolifération botulique et une production de toxine.

Un fromage traité à tartiner présentant un faible taux d'humidité (52,4%) et réalisé avec 1,35% de phosphate disodique et 1,1% de chlorure de sodium permet une quantité limitée de prolifération botulique et de production de toxine. Apparemment, aux taux d'humidité typiquement utilisés, des déviations sérieuses à partir des formulations normales doivent être faites avant qu'une prolifération botulique et une production de toxine importantes ne puissent se produire. Cette découverte suggère qu'un facteur de sécurité plutôt grand existe aux taux d'humidité typiques.

Cependant, le fait reste que des fromages traités à tartiner peuvent être légalement formulés à des taux d'humidité de 60%, c'est-à-dire conformément au 21 CFR 133.179(a)(3). Le taux d'humidité de 60% n'est pas utilisé comme matière pratique parce que la durée de vie à l'entreposage du produit est sérieusement limitée à ce taux d'humidité. Les données de Tanaka et cons. indiquent qu'une protection antibotulique n'est pas prouvée à des taux d'humidité supérieurs, en plus des autres problèmes d'altération. Les données du lot 2, rappor-



tées ci-dessus, confirment le manque de protection anti-
botulique dans des fromages traités à tartiner présen-
tant un taux d'humidité supérieur. Le lot 2 présente
un taux d'humidité de 57% et contient 1,45% de phosphate
5 disodique et 1,2% de chlorure de sodium. Cependant,
les données de cette expérience indiquent clairement
que des fromages traités à tartiner à haut taux d'humidi-
té peuvent être préparés avec l'addition de 250 ppm de
nisine. Une protection antibiotulique est procurée par
10 250 ppm de nisine dans un fromage traité à tartiner for-
mulé à un taux d'humidité de 57%, avec 1,45% de phos-
phate disodique et 1,2% de chlorure de sodium. Il appa-
raît que la nisine permet une formulation sûre, du point
de vue de la protection antibiotulique, des fromages trai-
15 tés à tartiner présentant à la fois de hauts taux d'hu-
midité et de faibles quantités de sodium.

Il doit être entendu que la présente invention
n'est en aucune façon limitée aux modes de réalisation
décrits ci-dessus et que bien des modifications peuvent
20 y être apportées sans sortir du cadre du présent brevet.

E

REVENDEICATIONS

1. Procédé de contrôle de la croissance des spores de Clostridium botulinum et de l'élaboration de toxine botulique par ceux-ci dans un produit de fromage traité, pasteurisé, à taux d'humidité élevé, d'au moins 54%, ce procédé comprenant l'addition au produit de fromage d'une quantité de nisine ou d'une culture productrice de nisine suffisante pour inhiber la croissance des spores botuliques.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le taux d'humidité du fromage est de 54% jusqu'à 60%.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que le taux d'humidité est d'environ 54 à environ 58%.

4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on ajoute, par gramme du produit de fromage, environ 2000 à environ 10000 unités internationales de nisine.

5. Procédé de contrôle de la croissance de spores de C. botulinum et de l'élaboration de la toxine botulique à partir de ce dernier dans un produit à base de fromage traité, tel que décrit ci-dessus, notamment dans les exemples donnés.

6. Produit à base de fromage traité, pasteurisé, contenant environ 100 à environ 300 parties par million de nisine.

7. Produit à base de fromage traité, pasteurisé, tel que décrit ci-dessus, notamment dans les exemples donnés, et/ou tel qu'obtenu selon le procédé suivant

l'une quelconque des revendications 1 à 5.

Bruxelles, le 27 octobre 1983

P. Pon de Aplin & Barrett, LTD.

P. Pon du Bureau GEVERS, société anonyme.

